

Commission of the European Communities

# AGRICULTURE



## C.E.C. PROGRAMME ON INTEGRATED AND BIOLOGICAL CONTROL

FINAL REPORT 1979/1983

EUR 8689



Commission of the European Communities

# AGRICULTURE

## C.E.C. PROGRAMME ON INTEGRATED AND BIOLOGICAL CONTROL

R. Cavalloro, A. Piavaux

FINAL REPORT 1979/1983

Directorate-General for Agriculture  
Directorate-General for Science, Research and Development

1984

EUR 8689

**Published by the  
COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES**

**Directorate-General  
Information, Market and Innovation**

**Bâtiment Jean Monnet  
LUXEMBOURG**

Neither the Commission of the European Communities nor any person acting on behalf of the Commission is responsible for the use which might be made of the following information.

Cataloguing data can be found at the end of this publication.

Luxembourg : Office for Official Publications of the European Communities, 1984

© ECSC - EEC - EAEC, Brussels-Luxembourg, 1984

*Printed in Italy*

European Communities - Commission

**EUR 8689 — Final Report of the CEC "Integrated and Biological Control"  
Programme 1979-1983**

*R. Cavalloro, A. Piavaux*

Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities

1984 - VIII, 476 pp. — 21.0x29.7 cm

Series Agriculture

DK DE EN FR GR IT

This publication presents the results of a five-year joint research programme (1979-1983) carried out between the Member Countries of the European Communities, following a Council decision of October 30, 1978 (78/902/CEC) concerning researches in the field of plant protection.

The main objective was a cooperative effort of the possibility of rationalising phytosanitary interventions. The aim is to achieve alternative control methods which are essentially biological in character and integrated natural mortality factors. The purpose is to reduce the use of those pesticide products which may lead to noxious effects in man and cause pollution of the environment.

This joint programme is termed "Integrated and biological control". It concern themes related to fruits (apples, citrus and olives), to vegetables crops (cabbages and carrots) and to cereals. It also includes meetings of experts, the exchange of research-scientists, and publications.

The excellent work summarized in this report puts into evidence the value and importance of the results obtained. Furthermore it permits an evaluation of the efforts of the CEC in the field of the coordination of researchers on plant protection at the level of the ten Member Countries.

## Biological Control of Cereal Aphids with Entomophthorales

B. Papierok (1), P. Silvie (1), J.P. Latge (1), C.A. Dedryver (2), J.M. Rabasse (3), G. Remaudiere (1)

(1) Insects Biological Control Unit, Pasteur Institute, Paris (France)

(2) INRA - Zoology Laboratory, Rennes Research Center, Le Rheu (France)

(3) INRA - Zoological and Biological Control Station, Antibes (France)

### Summary

Research done in France on Entomophthorales attacking cereal aphids gave published results in very numerous fields: biology, ecology, systematics, biochemical characterization of strains, physiology of growth and sporulation, production and formulation of inoculum, measure of infectivity, determination of factors governing the pathogenicity. Under oceanic climate, in western France, Erynia neoaphidis is the most effective and constant natural enemy of cereal aphids. In continental France the effect of Entomophthorales is more irregular but E. neoaphidis and Entomophthora planchoniana can develop spectacular epizootics. In greenhouses it is possible to permanently establish the disease after spraying an industrially produced inoculum. However the enzootic development of the entomophthorosis is not able to prevent the increase of the aphid populations. Major difficulties are: selection of the best suitable strain for the control strategy, depending on the population level, and obtaining an inoculum physiologically closer to that natural one. When taking into consideration the leading part often played by Entomophthorales in the regulation of aphid populations, further research is needed in these priority areas.

### LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LES PUCERONS DES CEREALES AU MOYEN DES ENTOMOPHTHORALES

#### Résumé

En France, les recherches menées sur les Entomophthorales pathogènes de pucerons des céréales ont abouti à des résultats dans de très nombreux domaines: biologie, écologie, systématique, caractérisation biochimique des souches, physiologie de la croissance et de la sporulation, production et formulation de l'inoculum, mesure de l'infectivité, analyse des facteurs déterminants du pouvoir pathogène. Sous le climat océanique de l'Ouest de la France, Erynia neoaphidis apparaît comme l'agent de régulation le plus efficace et le plus constant des populations de pucerons sur céréales. En zone continentale, l'action des champignons est plus irrégulière mais E. neoaphidis et Entomophthora planchoniana sont capables d'expansions épizootiques spectaculaires. A l'heure actuelle, en serre, il est possible grâce à l'application d'un inoculum qui peut être produit industriellement, d'implanter la maladie. Celle-ci ne se maintient cependant qu'à un niveau enzootique et n'affecte pas significativement la croissance des populations aphidiennes. Les difficultés majeures sont les suivantes: choix de la souche la mieux adaptée à la stratégie de lutte compte-tenu des niveaux de populations et obtention d'un inoculum physiologiquement plus proche de l'inoculum in vivo. Le rôle souvent prépondérant que jouent les Entomophthorales dans la nature justifie le développement des recherches dans ces directions.

## 1. INTRODUCTION

Depuis une vingtaine d'années, devant les problèmes posés par l'utilisation à grande échelle des insecticides chimiques, un intérêt croissant s'est manifesté pour les possibilités offertes par la lutte biologique. Les Entomophthorales, qui sont les seuls microorganismes capables de réduire à un niveau très bas les populations de Pucerons en zones tempérées, ont ainsi fait l'objet d'une attention privilégiée dans plusieurs pays, notamment en Europe.

En France, l'Unité de Lutte biologique contre les Insectes de l'Institut Pasteur (G. REMAUDIERE, J.P. LATGE et B. PAPIEROK) s'est donné comme objectif la mise au point d'un procédé permettant d'assurer l'implantation précoce d'un inoculum d'Entomophthorale dans les populations de pucerons des céréales afin de freiner leur expansion et de prévenir les dommages économiques. Les recherches ont été menées en collaboration avec C.A. DEDRYVER (I.N.R.A., Centre de Recherches de Rennes) et J.M. RABASSE (I.N.R.A., Station de Zoologie et de Lutte biologique d'Antibes).

## 2. PROGRAMME ET CONDUITE DES RECHERCHES

Un microorganisme candidat à la lutte biologique contre les pucerons doit présenter les principales caractéristiques suivantes:

- être facilement produit à une échelle industrielle, dans des milieux peu coûteux;
- conserver sa vitalité pendant plusieurs mois et être manipulable comme un produit phytosanitaire classique;
- être hautement infectif vis-à-vis du ou des insectes-cibles et posséder une spécificité parasitaire suffisamment étroite.

La mise au point d'une préparation biologique implique donc la mise en place d'un ensemble de recherches pluridisciplinaires couvrant à la fois l'aspect fondamental et appliqué. Ainsi, le programme "Entomophthorales" a concerné:

- la recherche de souches pathogènes des pucerons de céréales, en liaison avec les progrès de la connaissance écologique et systématique des Entomophthorales (Institut Pasteur). L'écologie de ces champignons dans les populations de pucerons des céréales a été étudiée dans l'Ouest de la France et dans le Bassin parisien (INRA Rennes, Institut Pasteur);
- l'estimation et la comparaison de la pathogénicité des souches vis-à-vis des trois principales espèces de pucerons (*Sitobion avenae* Fab., *Metopolophium dirhodum* Walker et *Rhopalosiphum padi* L.), en liaison avec un approfondissement de la connaissance des facteurs qui conditionnent la virulence (Institut Pasteur);
- la mise au point de méthodes industrielles permettant la fabrication des spores et leur conditionnement, en liaison avec les progrès des recherches sur la physiologie de la nutrition et de la sporulation du champignon (Institut Pasteur);
- la réalisation des premières expérimentations en serre (Rennes et Antibes) et en cultures de céréales d'hiver (Brie-Comte-Robert, Rennes, Gembloux et Littlehampton).

Des chercheurs stagiaires ont participé à la réalisation du programme: F. BEAUMONT, I. DELPUECH et G. PINOCHET (France), D. PERRY, P. BREY et D. MONTROSS (U.S.A.), L. SAMPEDRO et G. IBARRA (Mexique), B. TORRES (Brésil). Plusieurs collègues étrangers ont en outre apporté leur concours à certaines phases des travaux: N. WILDING (Rothamsted

Experimental Station), R. HALL (Glasshouse Crops Institute, Littlehampton), G. Latteur (Centre de Recherches agronomiques, Gembloux), G. HENNEBERT (Université catholique de Louvain), S. KELLER (Station fédérale de Recherches agronomiques de Zurich), A. UZIEL (Faculté d'Agriculture de Rehovot, Israël), J.J. SANGLIER (Sandoz, Bâle).

### 3. RESULTATS

#### 3.1. Systématique des Entomophthorales

Les données écologiques, morphologiques, physiologiques et biochimiques accumulées depuis une dizaine d'années ont permis de mettre en évidence des synonymies entre des espèces désignées sous des noms différents selon les auteurs, de construire une nouvelle classification et de corriger certaines erreurs introduites dans la nomenclature au cours des 100 dernières années. Les genres suivants, à potentialité entomopathogène, sont distingués par la morphologie de conidies primaires et secondaires: Conidiobolus (à conidies sphériques ou pyriformes avec papille arrondie ou pointue), Neozygites (à conidies primaires sphériques ou pyriformes avec papille tronquée et à capilloconidies secondaires munies d'un disque adhésif), Entomophthora (à conidies primaires campanulées), Erynia (à conidies primaires ovoïdes ou allongées portant une papille arrondie non séparée du corps par un épaulement, capilloconidies absentes), Zoophthora (à conidies cylindriques à fusiformes, à papille arrondie ou pointue, séparée du corps par un épaulement, capilloconidies présentes) (39, 40).

Grâce à cet effort de clarification, le statut des espèces pathogènes d'Aphides est désormais fixé sans ambiguïté. Les 6 espèces les plus communes sont désignées ainsi:

- Erynia neoaphidis Remaudière & Hennebert est l'espèce la plus fréquente dans le monde entier; elle était connue jusqu'à maintenant sous le nom de Entomophthora aphidis Hoffmann in Fresenius; son rôle dans la limitation des populations aphidiennes a été précisé en France océanique comme en France continentale (41),
- Entomophthora planchoniana Cornu,
- Conidiobolus obscurus (Hall & Dunn) Remaudière & Keller = Entomophthora thaxteriana Petch (42),
- Neozygites fresenii (Nowakowski) Remaudière & Keller = Entomophthora fresenii Nowakowski,
- Zoophthora phalloides Batko,
- Conidiobolus osmodes Drechsler.

Les études en systématique ont montré que la taxonomie fongique classique fondée sur des bases morphologiques peut aussi s'appuyer avantageusement sur des critères physiologiques (mode de formation des spores de résistance), pathologiques (comportement pathogène vis-à-vis des pucerons) et biochimiques (profil d'acides gras des lipides intracellulaires neutres et polaires, profils électrophorétiques d'isoenzymes, composition en sucres des parois (13, 14, 15, 16, 42)).

#### 3.2. Ecologie des Entomophthorales pathogènes de Pucerons des Céréales

L'analyse des données recueillies depuis 1975 met en évidence le rôle joué par Erynia neoaphidis, Entomophthora planchoniana et Conidiobolus obscurus dans la régulation des peuplements de pucerons sur Céréales. Des différences importantes sont notées dans l'incidence res-



pective de ces 3 Entomophthorales, non seulement en fonction de l'hôte mais surtout en fonction des conditions climatiques de la région considérée.

Dans le Bassin parisien, deux Entomophthorales sont susceptibles de se développer certaines années d'une manière épizootique dans les populations des pucerons des céréales: S. avenae et surtout M. dirhodum; E. neoaphidis en périodes humides, E. planchoniana en périodes plus chaudes et plus sèches. Ainsi, en 1981, la population de M. dirhodum est anéantie par E. neoaphidis, la croissance des taux de mycose étant très rapide: 0,3 % le 24 juin, 2 % le 1er, 20 % le 7 et 33 % le 10 juillet.

Dans l'Ouest de la France, les Entomophthorales apparaissent comme les agents de régulation les plus efficaces et les plus constants des populations de pucerons des céréales. L'action de E. neoaphidis est toujours prépondérante vis-à-vis de M. dirhodum et de S. avenae, E. planchoniana apparaît généralement plus tard que E. neoaphidis qui est l'espèce ayant la plus grande période d'activité et infectant à un moment donné le plus grand nombre de pucerons. C. obscurus a toujours un rôle très faible et semble davantage parasiter les pucerons situés sur le feuillage que ceux situés sur les épis (3, 4, 5).

Au plan pratique, l'étude des situations aphidiennes observées depuis 1975 sur céréales nous conduit à considérer les traitements préventifs qui tendent de plus en plus à se généraliser contre les pucerons de ces cultures comme un non-sens économique et une grave atteinte au fragile équilibre du milieu. Au cours des 7 dernières années ont été notées 2 années de pullulations aphidiennes en céréales, les seules au cours desquelles des traitements aphicides locaux pouvaient être justifiés par leur rentabilité; ces mêmes traitements appliqués au cours des 5 autres années l'ont été en pure perte. Une telle situation justifie l'analyse précise, réalisée à Rennes (INRA), des nombreuses données accumulées dans l'Ouest de la France. Il en ressort que les facteurs-clés conditionnant l'évolution ultérieure des populations aphidiennes sur céréales y sont les températures moyennes de février et la densité des pucerons à l'épiaison, le nombre de jours de pluies en mai semblant être le facteur principal de l'action des Entomophthorales. On peut donc envisager pour ces régions la mise en place d'un système d'avertissements agricoles fondés sur un modèle intégrant ces différentes composantes.

### 3.3. Physiologie des Entomophthorales. Production et conservation de l'inoculum

Trois types de cellules interviennent dans le cycle des Entomophthorales, le corps hyphal, la spore de résistance (absente chez certaines espèces, en particulier chez Erynia neoaphidis) et la conidie (qui est l'organe infectieux). En raison de la difficulté d'obtention à grande échelle des conidies et de leur faible durée de survie (de quelques mn à quelques jours), les études relatives à la production de l'inoculum n'ont concerné que les corps hyphaux et les spores de résistance.

#### 3.3.1. Exigences nutritionnelles des Entomophthorales

Les divers genres d'Entomophthorales présentent de grandes différences dans leurs exigences nutritionnelles. Hormis Massospora

et Neozygites dont aucune espèce n'a pu être cultivée à ce jour, les résultats obtenus montrent que Entomophthora est le genre le plus exigeant (E. planchoniana n'a jamais été cultivé à ce jour). Les genres Erynia et surtout Conidiobolus apparaissent comme les moins exigeants. D'une manière générale, les espèces à tendance saprophytique (Conidiobolus) ont des besoins nutritionnels très inférieurs à ceux des genres présentant une spécificité élevée vis-à-vis des insectes (Massospora, Neozygites, Entomophthora et Zoophthora).

Le développement de 26 espèces d'Entomophthorales est possible sur un milieu simple à base de 1 % d'extrait de levure et 4 % de glucose, avec chez certaines espèces appartenant aux genres Entomophthora et Zoophthora, une croissance moins importante que celle obtenue sur jaune d'oeuf ou sur des milieux très concentrés en hydrolysats de protéines et lipides d'origine animale ou végétale (10, 12).

Les recherches sur la physiologie et la nutrition des Entomophthorales ont été particulièrement développées dans le cas de Conidiobolus thromboides (34) et dans celui de C. obscurus. Un milieu chimiquement défini optimal pour la croissance et la sporulation de cette dernière espèce a été mis au point: il contient 11 acides aminés, 4 vitamines (thiamine, biotine, acide folique et penthoténate) et des sels (phosphates, sulfates de Mg, Mn et de Zn) (25).

### 3.3.2. Production des spores de résistance de C. obscurus

La production des spores de résistance de quelques souches de C. obscurus a été mise au point en fermenteur en culture discontinue (8, 9, 11, 17). Une excellente sporulation est obtenue dans un milieu à base de glucose et d'extrait de levure. Afin d'abaisser le prix de revient, divers résidus industriels riches en azote ont été expérimentés avec succès pour remplacer l'extrait de levure. Des rendements importants de spores (jusqu'à  $2 \times 10^6$  sp/ml) ont été obtenus avec un milieu à base d'huile de maïs (source de carbone) et d'extrait soluble de maïs (source d'azote) (extrait N° 14850; Société des Produits du Maïs).

Ces procédés de production, mis au point en fermenteur de 20 l ont été transposés à l'échelle industrielle (société ORSAN), avec des rendements en spores de l'ordre de  $10^6$  sp/ml comparables à ceux obtenus au laboratoire. Toutefois, très peu de fermentations ont été réussies dans des cuves de 100 à 1000 l. La plupart des accidents survenus en fermenteurs industriels sont dus à des contaminations précoces ou tardives dont l'origine n'a pas été élucidée. Ces inconvénients résultant de la longueur de la fermentation (7 à 8 jours à 20°C), un nouveau procédé de fermentation a été mis au point (46). Il s'appuie sur le fait qu'il n'y a plus d'échanges avec le milieu extérieur dès que la préspore est formée. Au 4ème jour de la culture, les préspores sont extraites du fermenteur, lavées à l'eau courante, puis enrobées d'argile humide; après 4 à 5 jours à 20°C, leur évolution est terminée. La transposition à l'échelle industrielle de ce nouveau procédé n'a pas été entreprise.

### 3.3.3. Production des corps hyphaux de E. neoaphidis

Les souches de E. neoaphidis présentent une grande variabilité dans leur aptitude à se développer du milieu artificiel. Après des essais en fioles agitées sur un grand nombre de souches entretenues au laboratoire, c'est une souche isolée par G. LATTEUR au Brésil qui a été retenue en

raison de ses faibles exigences et de son taux de croissance élevé.

En fermenteur de 20 litres, le maximum de croissance est atteint en 3 jours dans les conditions suivantes: milieu à base de 60 g de glucose + 20 g d'extrait de levure par litre, température 20°C, vitesse de rotation 700 tpm, aération 0,1 vvm. Le rendement en poids sec est de 0,38 g de mycélium par g de nutriments apportés (26).

La technique de production d'*Hyphomycètes* en milieu solide a également été adaptée à *E. neoaphidis*; avec du mycélium produit en culture liquide, on inocule des grains de riz ou d'autres substrats, imbibés ou non de milieu. Après 1 ou 2 semaines, le champignon est bien ancré sur son support et commence à sporuler (11).

#### 3.3.4. Germination des spores de résistance de *C. obscurus*

Les spores de résistance de *C. obscurus* sont caractérisées par un état de dormance qui est levé au bout d'un stockage de 3-4 mois à +4°C en milieu humide, conditions dans lesquelles les spores conservent leur vitalité pendant au moins un an (21, 33). La levée de la dormance peut être obtenue après enrobage des spores dans de l'argile (35). Les meilleurs résultats sont obtenus avec le mélange spore:eau:attapulгите réalisé dans les proportions 1:2:5 (20).

La germination des spores mûres (22) est obtenue en plaçant celles-ci dans l'eau, à une température comprise entre 12 et 16°C. Certains fongicides peuvent diminuer les taux de germination aux doses d'emploi préconisées. La germination des spores dont la dormance a été levée n'est pas synchrone: les premiers tubes germinatifs apparaissent après 3 ou 4 jours mais le maximum de germination est atteint seulement 12 jours plus tard à 12°C comme à 16°C. Jusqu'à présent, il n'a pas été possible de réduire cet écart important.

#### 3.3.5. Survie du mycélium de *E. neoaphidis*

La survie à moyen terme des corps hyphaux a été étudiée sur du mycélium formé *in vivo* et *in vitro* et placé à différentes températures (+4 à +20°C) et humidités relatives (20 à 100 %). Dans les cadavres entiers ou broyés, le champignon garde sa vitalité pendant 4 mois à 20 et 42 % d'H.R. à +4°C, pendant seulement 2 mois à +20°C. Le mycélium produit en milieu liquide ne peut être conservé plus d'un mois à +4°, ni plus de 2 semaines à +20°C, quelle que soit l'H.R. comprise entre 20 et 81 %. En revanche, le mycélium cultivé sur grains de riz peut être gardé 2 mois à +4° et 1 mois à +20°C.

Les différences de résistance constatées entre les mycéliums *in vivo* et *in vitro* peuvent être reliées aux différences morphologiques observées entre les corps hyphaux dans le cadavre (courts, renflés, avec un protoplasme dense) et ceux produits en milieu artificiel (allongés, ramifiés et très souvent très vacuolisés). La pression osmotique (455 mOs dans le puceron et 400 mOs dans le milieu) ne semble pas intervenir.

Un facteur favorable à la conservation des sclérotas pourrait être le dessèchement très progressif du mycélium dans le puceron, phénomène au niveau duquel intervient probablement la cuticule. La morphologie particulière des noyaux et des mitochondries des corps hyphaux déshydratés dans le cadavre montre qu'ils se trouvent dans un état de "vie ralentie". Lorsque le mycélium est réhumidifié, il reprend son activité, le noyau et les mitochondries retrouvant leur aspect normal. La déshydratation rapide du mycé-

lium in vitro pourrait être un des facteurs expliquant ses faibles potentiels de survie (45).

La survie du mycélium obtenu de culture a pu être prolongée par enrobage dans des argiles de type attapulгите et kaolinite. Le mycélium homogénéisé avec 1 part d'eau et 1 ou 2 parts d'argile, a pu être conservé 2 mois à +4° et 1 mois à +20°C, soit deux fois plus longtemps que le même mycélium non enrobé. L'étude, en microscopie électronique en balayage, de la structure environnant la cellule fongique dans un mélange argile-mycélium montre que la survie de ce dernier est directement sous la dépendance de la porosité de l'échantillon. Dans le cas de la kaolinite ou de l'attapulгите, dont la porosité est faible (de l'ordre de 1  $\mu$ m), les particules des argiles adhèrent bien aux parois fongiques. A l'inverse, la porosité élevée de produits tels que la silice de diatomées ou du silicate de calcium entraînent un dessèchement rapide du mélange, d'où un faible temps de survie du champignon.

En serre, le mycélium pulvérisé est capable de projeter des conidies pendant une durée excédant rarement 3 jours (1, 7). Une suspension très concentrée assure une meilleure survie. Dans certaines conditions, le mycélium pulvérisé sur le sol est capable de se maintenir vivant plus longtemps que celui appliqué sur les plantes.

### 3.4. Pouvoir pathogène des Entomophthorales

#### 3.4.1. Pouvoir pathogène de C. obscurus

Au sein de l'espèce C. obscurus, les souches qui poussent rapidement, plissent le milieu et produisent facilement des spores de résistance (21) sont moins infectives que celles qui ont une croissance plus lente, plissent peu le milieu et ne donnent pas de spores. Les 2 types de souches se distinguent également par des différences dans les durées d'incubation de la maladie et dans le nombre de conidies émises par les cadavres (31, 42). L'étude de ces paramètres de l'infection revêt une grande signification écologique. Les souches qui devraient se révéler les plus actives sont celles caractérisées à la fois par une CL 50 faible, un pouvoir multiplicateur élevé et un cycle d'infection de courte durée (30).

La stabilité de l'infectivité d'une souche entretenue par repiquages successifs pendant plus de 3 ans a été démontrée. Il apparaît par ailleurs que le niveau d'infectivité de C. obscurus se stabilise dès la mise en culture; pour une même souche, les conidies issues de pucerons infectés ont une CL 50 2 fois plus faible que celles issues de la culture in vitro (27).

#### 3.4.2. Les facteurs déterminants du pouvoir pathogène de C. obscurus

Parmi les facteurs dépendant de l'hôte influant sur le pouvoir pathogène de C. obscurus, le stade et l'état physiologique jouent un rôle significatif. Les adultes aptères de A. pisum sont moins sensibles que les adultes ailés originaires du même clone.

Le jeûne des pucerons, préalablement à l'infection, accroît significativement leur sensibilité par rapport à celle d'insectes normalement alimentés.

L'étude de l'évolution des conidies à la surface des pucerons a montré que chez les souches agressives de C. obscurus, les conidies germent en donnant un tube germinatif; à l'inverse, la majorité des souches non agressives donnent des conidies secondaires (19). L'étude biochimique de

l'épicuticule du puceron a révélé que certains constituants hydrophiles et hydrophobes de la cuticule stimulent la germination des conidies des seules souches agressives (2, 23, 43, 44). Un autre aspect a été abordé, celui des capacités d'adhérence de la conidie sur le puceron: un mucus présent à la surface de la conidie jouerait un rôle dans l'adhérence de celle-ci à la cuticule de l'hôte.

Les souches agressives ont pu être distinguées des souches non agressives par la considération de 2 complexes enzymatiques: lipase, estérase et chitinase (24).

L'étude immunologique entreprise sur différentes souches de C. obscurus a montré que ce champignon est faiblement immunogène et n'a mis en évidence aucune communauté antigénique entre le puceron hôte et les souches agressives. Celles-ci ont pu être séparées de souches non agressives par analyse immunoélectrophorétique des antigènes confrontés aux sérums épuisés par les antigènes hétérologues (au moins une bande commune à chaque catégorie de souches (43).

L'étude électrophorétique des protéines totales d'une cinquantaine de souches, a été effectuée en système unidimensionnel en gel de polyacrylamide. Parmi les 17 systèmes enzymatiques testés, 7 seulement produisent des profils avec des bandes bien définies: il s'agit des estérases, glucose phosphate isomérase, phosphoglucose mutase, malate déshydrogénase, glucose phosphate 6 déshydrogénase, leucine aminopeptidase et de la NADP transhydrogénase.

Un regroupement des souches a pu être réalisé après comparaison de leurs zymogrammes en fonction de l'aptitude à donner les spores durables in vitro (13).

#### 3.4.3. Physiopathologie de la mycose à C. obscurus

La composition en acides gras du mycélium de C. obscurus qui s'est développé dans son hôte est identique à celle du puceron sain (18). Le phénomène de mimétisme des acides gras se retrouve lorsqu'on remplace le glucose par de l'huile de tournesol dans le milieu de culture; dans ce cas, le profil d'acides gras du champignon devient similaire à celui de l'huile. Cette découverte pourra être mise à profit dans la recherche de milieux de culture capables de fournir une qualité de mycélium comparable à celle des mycéliums formés in vivo.

#### 3.4.4. Comparaison du comportement pathogène de plusieurs Conidiobolus

La pathogénie de 2 espèces de Conidiobolus attaquant normalement les insectes (C. obscurus à spectre d'activité restreint aux pucerons et C. apiculatus à spectre d'activité plus large) a été comparée à celle de 3 espèces à tendances saprophytiques (C. coronatus, C. osmodes et C. thromboides). Il est apparu ainsi différents degrés dans les symptômes de réaction de l'hôte tels que la mélanisation du tégument aux points de pénétration des tubes germinatifs, le temps d'incubation de la maladie et l'intensité de sporulation du cadavre (29). La brièveté du temps d'incubation résulte probablement de l'intervention de substances toxiques. Il a en effet été établi que vis-à-vis des chenilles de Galleria, les filtrats de culture de 4 espèces de Conidiobolus possèdent, à des degrés variables, une activité toxique; ce sont, dans l'ordre d'activité décroissante: C. coronatus, C. thromboides, C. osmodes et C. apiculatus. Les filtrats de C. obscurus se sont révélés sans effet.

### 3.4.5. Pouvoir pathogène de *E. neoaphidis*

Les CL 50 varient selon les souches de *E. neoaphidis* de 1 à quelques dizaines de conidies par mm<sup>2</sup>. La souche brésilienne (1299) retenue en raison de sa rapidité de développement en fermenteur, a été éprouvée sur plusieurs espèces et clones de pucerons: *Aphis fabae*, *Aphis gossypii*, *Metopolophium dirhodum*, *Myzus persicae*, *Aulacorthum circumflexum* et *Schizaphis graminum* se sont avérés sensibles ainsi que le clone B de *Acyrtosiphon pisum* isolé de Haute-Savoie. En revanche, le clone A de *A. pisum* isolé de La Varenne est apparu résistant à *E. neoaphidis*; ce clone particulier s'était déjà révélé résistant à 2 autres Entomophthorales, *C. obscurus* (28) et *Z. radicans*. Trois autres espèces de pucerons (en particulier *Sitobion avenae*) sensibles aux souches de *E. neoaphidis* originaires d'Europe se sont montrées résistantes à la souche brésilienne, ce qui indiquerait une variabilité infraspécifique marquée chez *E. neoaphidis*.

### 3.4.6. Pouvoir pathogène de *Zoophthora radicans*

Chez *Zoophthora radicans*, espèce à large spectre d'hôtes, les souches isolées de pucerons ou d'autres Homoptères (Psyllides ou Jassides) ont vis-à-vis des Pucerons une infectivité plus élevée (en termes de CL 50) que celles originaires d'insectes d'autres ordres (Diptères, Lépidoptères, Hyménoptères). Les souches isolées d'Homoptères (Aphides, Jassides et Psyllides) sporulent abondamment sur pucerons en donnant le plus souvent des conidies, plus rarement des spores de résistance. Dans les mêmes conditions expérimentales, les souches provenant de Lépidoptères sporulent moins intensément alors que celles isolées de Diptères et d'Hyménoptères ne produisent qu'un nombre extrêmement faible de conidies et pratiquement jamais de spores durables. Dès que les cadavres sont placés dans les conditions d'humidité favorables à l'émission des conidies, une lyse partielle du mycélium se produit. Ce comportement du champignon dans un hôte très éloigné systématiquement de son hôte originel apparaît comme le reflet d'une impasse biologique et écologique (32).

### 3.5. Essais d'application d'Entomophthorales en plein champ et en serre

Des applications de spores de résistance de *C. obscurus* et de corps hyphaux de *E. neoaphidis* ont été réalisées d'une part sur cultures de céréales et d'autre part sur différentes cultures en serre.

#### 3.5.1. Essais d'application de spores de résistance de *C. obscurus*

La première application de spores de résistance de *C. obscurus* a été réalisée sur *Rhopalosiphum padi* en serre, en 1979, avec des spores mûres incubées 4 jours dans l'eau (donc commençant à germer le jour suivant l'aspersion). Les premiers pucerons morts de mycose ont été détectés 4 jours après le traitement. Ensuite le champignon s'est maintenu d'une manière enzootique et la croissance de la population a été plus faible dans la serre traitée que dans la serre témoin (6).

Les essais prévus sur céréales en plein champ en 1980 n'ont pas apporté de résultats tangibles car le peuplement aphidien était trop faible et n'a jamais manifesté une tendance à l'évolution exponentielle. Ils ont néanmoins montré que la dormance des spores appliquées sur le terrain pouvait être levée 1 à 2 mois plus tôt que les spores vernalisées dans des conditions artificielles à une température constante de +4°C (26, 37).

Les essais prévus en 1981 ont dû être annulés en raison de la quantité insuffisante et de la mauvaise qualité des spores fournies par l'industrie. Deux essais accessoires ont pu toutefois être mis en place en serre: sur laitue à Rennes (contre Aulacorthum solani, Nasonovia ribis-nigri et Macrosiphum euphorbiae) et sur aubergine à Antibes (contre Macrosiphum euphorbiae et Myzus persicae). Pour compenser la très faible capacité de germination des spores (5 à 7 % maximum), des doses énormes ont été employées. La mycose est apparue relativement tard dans les populations de pucerons (10 et 17 jours après le traitement, respectivement à Rennes et à Antibes) et sa dissémination a été très lente; les taux de mycose ont été 6 à 8 % à Rennes, et seulement 0,1 % à Antibes (36, 38).

### 3.5.2. Essais d'application de mycélium de E. neoaphidis

Le seul essai d'application de mycélium de E. neoaphidis (souche brésilienne) sur céréales a été réalisé en 1981 dans un des dispositifs expérimentaux qui n'avaient pu être utilisés pour C. obscurus, faute de quantités suffisantes d'inoculum. Le déroulement de l'essai a été contrarié par la présence d'une mycose spontanée à E. neoaphidis qui s'est développée d'une manière épizootique dans les parcelles traitées comme dans les parcelles témoins, rendant impossible toute appréciation de l'effet du traitement proprement dit (38).

Des applications de mycélium de E. neoaphidis ont été effectuées en serre sur laitue (Rennes, INRA) et sur aubergine (Antibes, INRA) (1, 7, 26, 36, 38).

A chaque fois, le traitement est suivi de l'apparition de la mycose qui occasionnellement se dissémine dans les populations des zones traitées et même des zones non traitées. Ainsi, dans le meilleur des cas (sur laitue à Rennes, en 1981), le taux de mycose atteint 38 %, 18 jours après la pulvérisation, dans la population de Macrosiphum euphorbiae dont la croissance se trouve arrêtée. Bien que la population de Aulacorthum solani soit affectée par un taux de mycose de 20 %, sa croissance n'est que ralentie (26, 38).

## 4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les travaux effectués en France sur les Entomophthorales pathogènes de pucerons de céréales ont conduit à de nombreux résultats, dans des domaines très variés, relevant de la recherche fondamentale comme de la recherche appliquée.

### 4.1. Les Entomophthorales comme ennemis naturels des pucerons

Les Entomophthorales jouent un rôle souvent prépondérant dans la régulation des populations aphidiennes. En plein champ, Erynia neoaphidis est l'espèce qui présente la plus forte tendance à l'expansion épizootique, particulièrement lorsque les populations aphidiennes ont atteint des niveaux élevés. La rapidité avec laquelle cette espèce se multiplie dans les conditions naturelles est remarquable (taux de mycose passant de 5 à 33 % en 5 jours, à Brie-Comte-Robert en 1981), et traduit un potentiel épizootique exceptionnel. Entomophthora planchoniana est également capable de développement épizootique contrairement à Conidiobolus obscurus; cette dernière espèce dont l'action est plus discrète, a l'avantage de se maintenir aux dépens de colonies très faibles.

L'analyse des résultats obtenus grâce aux recherches écologiques intensives réalisées dans l'Ouest de la France (INRA, Rennes) montre que l'on peut maintenant envisager l'établissement d'un modèle de prévision de l'évolution des populations aphidiennes basé sur un schéma climatique. L'intérêt évident d'une telle démarche devrait inciter à étendre les enquêtes écologiques systématiques aux autres régions céréalières pour lesquelles on manque généralement de données suffisamment précises.

Les essais d'infection en serre à l'aide d'un inoculum produit *in vitro* ont prouvé qu'il était possible d'implanter la maladie dans les populations aphidiennes à un niveau enzootique sans pouvoir cependant freiner significativement leur croissance. En revanche, dans les mêmes conditions de culture (brumisations répétées), des Entomophthorales peuvent apparaître spontanément et se développer de manière épizootique. Les causes de ce phénomène devraient être recherchées.

#### 4.2. Production et conservation des Entomophthorales

Les recherches sur la physiologie et la production des Entomophthorales ont permis de vaincre l'une après l'autre les difficultés représentées notamment par la culture du champignon, l'obtention de hauts rendements en spores durables de *C. obscurus* et la levée de leur dormance. Il a été montré que les procédés mis au point sont transposables à l'échelle industrielle.

Les faibles possibilités de conservation du mycélium de *E. neoaphidis* constituent un handicap majeur à l'utilisation de cette espèce. Des différences sont observées dans les durées de survie entre corps hyphaux formés *in vivo* et *in vitro*. Par ailleurs, l'enrobage du mycélium dans certaines argiles (de type attapulгите ou kaolinite) augmente son temps de survie. Ce phénomène qui dépend étroitement de la température et de l'humidité, est lié à la faible porosité du produit enrobeur. Les études en microscopie électronique ont montré en outre qu'à l'intérieur du puceron, le corps hyphal déshydraté se maintient plusieurs mois dans un état de "vie ralentie" qui revient à la normale si le champignon est réhumidifié. Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, il conviendrait de mettre au point:

- a) une méthode de production d'un mycélium dont les caractéristiques seraient plus proches de celles du mycélium formé dans l'insecte;
- b) un procédé de déshydratation "contrôlée" du mélange formulé.

#### 4.3. Pouvoir pathogène des Entomophthorales

Des progrès importants ont été réalisés dans la connaissance des facteurs déterminants du pouvoir pathogène des Entomophthorales, en particulier de *Conidiobolus obscurus*. Ils soulignent l'intérêt du modèle *C. obscurus*/puceron pour l'étude approfondie des relations champignon parasite-insecte hôte.

La méthode de mesure comparative de l'infectivité des Entomophthorales est maintenant bien au point. La CL 50 d'une souche vis-à-vis d'un insecte donné ne représente cependant qu'un des éléments du comportement pathogène, au niveau duquel interviennent également la durée d'incubation de la mycose (intervalle entre deux cycles d'infection) et l'intensité de sporulation du champignon sur le cadavre (pouvoir multiplicateur de l'inoculum). L'approche analytique réalisée jusqu'à présent n'a fait intervenir que ces trois éléments; elle ne permet pas de juger réellement du potentiel épizootique d'une souche d'Entomophthorale. L'étude de celui-ci pourrait



être abordée avec une méthode analogue à celle utilisée par R. HALL dans le cas du Deutéromycète Verticillium lecanii et fondée sur la quantification du pourcentage de transmission de la maladie du puceron à sa descendance.

Une différence essentielle a été mise en évidence entre espèces de Conidiobolus à tendance saprophyte et espèce de Conidiobolus à tendance parasite. Les premières (C. osmodes, C. thromboides) peuvent avoir une infectivité extrêmement élevée et tuent l'insecte très rapidement. En revanche, les insectes infectés par les secondes meurent au bout de quelques jours, l'intensité de sporulation du champignon sur le cadavre est généralement plus forte. L'action des espèces à tendances saprophytiques peut être comparée à une action insecticide. Leur emploi pourrait être envisagé sur des populations de pucerons ayant atteint un niveau important.

#### 4.4. Essais d'application des Entomophthorales

Les raisons pouvant être à l'origine de l'absence d'expansion épidémiologique de la maladie introduite artificiellement dans des populations aphidiennes doivent être surtout recherchées au niveau d'une faiblesse éventuelle du potentiel épidémiologique des souches utilisées et au niveau des très strictes conditions d'humidité (H.R. proche de 100 %) qu'elles exigent pour la réalisation de chaque cycle d'infection. La recherche de souches à fortes capacités épidémiologiques et à faibles exigences écologiques devrait faire l'objet d'une attention privilégiée.

#### 5. CONCLUSION

Les résultats obtenus pendant les 5 dernières années par les chercheurs français travaillant sur les Entomophthorales pathogènes de Pucerons, confirment l'intérêt d'aborder un problème de recherche appliquée avec la collaboration de scientifiques appartenant à de nombreuses disciplines: entomologie, mycologie, biochimie, immunologie, écologie, pathologie. Des problèmes fondamentaux intéressants ont été soulevés, tels que ceux liés à la différenciation biochimique de la spore, à la classification de ce groupe fongique ou aux facteurs déterminants du pouvoir pathogène. Toutefois, l'efficacité d'une méthode de lutte biologique contre les Aphides à l'aide des Entomophthorales n'a pas encore été pleinement démontrée alors que ces champignons occupent le plus souvent la première place dans le cortège de leurs ennemis naturels. Ceci souligne la difficulté qu'il y a à domestiquer un agent biologique, difficulté que seul permettra de lever la poursuite de l'effort de recherche.

#### **Publications - Contract No. F-0704**

DEDRYVER C.A., PERRY D., LATGE J.P., PAPIEROK B. et REMAUDIERE G. (1979) Première implantation de *Entomophthora obscura* dans une population de *Rhopalosiphum padi* en serre, à l'aide de spores de résistance produites *in vitro*. In: Lutte biologique et intégrée contre les pucerons. Colloque franco-soviétique, Rennes, 26-27 septembre 1979. 67-72

LATGE J.P., PERRY D.F., REISINGER O., PAPIEROK B. et REMAUDIERE G. (1979) Induction de la formation des spores de résistance d'*Entomophthora obscura* Hall & Dunn. C.R. Acad. Sci. Paris. 288, sér. D, 599-601

PAPIEROK B. et WILDING N. (1979) Mise en évidence d'une différence de sensibilité entre 2 clones du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum* Harr. (*Hom. Aphididae*) exposés à 2 souches du champignon Phycomycète *Entomophthora obscura* Hall & Dunn. C.R. Acad. Sci. Paris, 288, série D. 93-95

REMAUDIERE G., LATGE J.P. et PAPIEROK B. (1979) Reconsidération taxonomique et *Entomophthora obscura* Hall & Dunn. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 130A, 151-162

DEDRYVER C.A. (1980) Premiers résultats concernant le rôle de trois espèces d'*Entomophthora* dans la limitation des populations de pucerons des céréales dans l'Ouest de la France. Bull. IOBC/WPRS. 3 (4), 5-10

- LATGE J.P. (1980) Sporulation d'*Entomophthora obscura* Hall & Dunn en culture liquide. Can. J. Microbiol. 26, 1038-1048
- LATGE J.P. et DE BIEVRE C. (1980) Lipid composition of *Entomophthora obscura* Hall & Dunn. J. Gen. Microbiol. 121, 151-158
- LATGE J.P., KING D.S. et PAPIEROK B. (1980) Synonymie de *Entomophthora virulenta* et de *Conidiobolus thomboides*. Mycotaxon. 11, 255-268
- LATGE J.P. et PERRY D.F. (1980) The utilization of an *Entomophthora obscura* resting spore preparation in biological control against aphids. Bull. SROP. III. 4, 19-25
- PAPIEROK B. et COREMANS-PELSENEER J. (1980) Contribution à l'étude de *Conidiobolus osmodes* Drechsler (Zygomycètes *Entomophthoraceae*) agent occasionnel d'épizooties chez les pucerons (Homoptères *Aphididae*). Cryptog. mycol. 1, 111-117
- PAPIEROK B. et LATGE J.P. (1980) Considérations sur le pouvoir pathogène de *Entomophthora obscura* Hall & Dunn à l'égard des pucerons des céréales. Bull. OILB/SROP, 3 (4), 27-29
- PERRY D.F. (1980) Contribution à l'étude de la formation de la germination et de la conservation des spores durables d'Entomophthorales en vue de la lutte biologique contre les pucerons. Thèse Doc. 3ème cycle. Univ. Paris VI
- PERRY D.F. et LATGE J.P. (1980) Chemically defined media for growth and sporulation of *Entomophthora virulenta*. J. Invertebr. Pathol. 35, 43-48
- REMAUDIERE G. et HENNEBERT G.L. (1980) Révision systématique de *Entomophthora aphidis* Hoffm. in Fres. Description de deux nouveaux pathogènes d'Aphides. Mycotaxon. 11, 269-321
- REMAUDIERE G. et KELLER S. (1980) Révision systématique des genres d'*Entomophthoraceae* à potentialité entomopathogène. Mycotaxon. 11 (1), 323-338
- BEAUMONT F. (1981) Lutte biologique contre les pucerons des salades, en serre, à l'aide d'entomophthorales. Mémoire E.N.S.F.A. 53 p.
- DEDRYVER C.A. (1981) Biologie des pucerons des céréales dans l'Ouest de la France. Répartition spatio-temporelle et action limitative de trois espèces d'*Entomophthoraceae*. Entomophaga. 26 (4), 381-393
- LATGE J.P. (1981) Mass production, storage and formulation of resting spores of *Conidiobolus obscurus* (Hall & Dunn) Rem. & Kell. In: Euraphid, Rothamsted, 1980. Ed. L.R. Taylor. 39-40
- LATGE J.P. (1981) Comparaison des exigences nutritionnelles des Entomophthorales. Ann. Microbiol. (Ins. Pasteur). 132B, 299-306
- PAPIEROK B. et WILDING N. (1981) Etude du comportement de plusieurs souches de *Conidiobolus obscurus* (Zygomycètes *Entomophthoraceae*) vis-à-vis des pucerons *Acyrtosiphon pisum* et *Sitobion avenae* (Hom. *Aphididae*). Entomophaga. 26, 241-249
- PINOCHET G. (1981) Essais d'utilisation de deux Entomophthorales dans la lutte contre les pucerons en serre d'aubergines. Mémoire D.A.A. 29 p.
- REMAUDIERE G. (1981) Provisional field trials with *Conidiobolus obscurus* and proposed trials for 1981. In: Euraphid, Rothamsted 1980. Ed. L.R. Taylor. 41-42
- REMAUDIERE G., LATGE J.P. et MICHEL Marie-France (1981) Ecologie comparée des Entomophthoracées pathogènes de pucerons en France littorale et continentale. Entomophaga. 26, 157-178
- BREY P.T. (1982) Contribution à l'étude de la pathogénicité de *Conidiobolus obscurus* vis-à-vis du puceron *Acyrtosiphon pisum*. Thèse 3ème cycle, Paris, VI. 64 p. + VII p. + app.
- DELPUECH I. (1982) Lutte biologique contre les pucerons en serre. Essai d'utilisation des Entomophthorales. Mémoire D.A.A., I.N.A.P.G. 35 p.
- LATGE J.P. (1982) Production of Entomophthorales. Proc. IIIrd int. Coll. Invertebrate Pathol., Brighton. 164-169
- LATGE J.P., PAPIEROK B. et BREY P.T. (1982) Variation of the fatty acid composition of *Conidiobolus obscurus* depending on the *in vivo* and *in vitro* development. J. Invertebr. Pathol. 40, 274-278
- LATGE J.P., PREVOST M.C., PERRY D.F. et REISINGER O. (1982) Etude en microscopie électronique de *Conidiobolus obscurus*. I. Formation et germination des azygospores. Can. J. Bot. 60, 413-431
- LATGE J.P., SAMPEDRO-ROSAS L. et BREY P.T. (1982) Physiological study of the pathogenicity of *Conidiobolus obscurus*. Abst. IIIrd int. Coll. Invertebrate Pathol. Brighton, 109
- PAPIEROK B. (1982) Entomophthorales: virulence and bioassay design. Proc. IIIrd int. Coll. Invertebrate Pathol., Brighton, 176-181
- PERRY D.F. et LATGE J.P. (1982) Dormancy and germination of *Conidiobolus obscurus* resting spores. Trans. Br. mycol. Soc. 78, 221-225
- SAMPEDRO L. (1982) Agressivité de *Conidiobolus obscurus* vis-à-vis du puceron du pois *Acyrtosiphon pisum*. Thèse 3e cycle, Univ. Paris XI. 101 p.
- DEDRYVER C.A. (1983) Field pathogenesis of three species of entomophthorales of cereal aphids in Western France. In Aphid Antagonists. EC Experts' Meeting, Portici, nov. 1982. Ed. R. Cavalloro, A.A. Balkema. Publ. Rotterdam. EUR 8601 EN 11-19
- LATGE J.P. (1983) *Conidiobolus obscurus* et les Entomophthorales pathogènes de pucerons. Thèse Dr. es. Sc., Université Paris XI. 119 p. + X
- LATGE J.P., SILVIE P., DEDRYVER C., RABASSE J.P., PAPIEROK B. et REMAUDIERE G. (1983) Advantages and disadvantages of *Conidiobolus obscurus* and *Erynia neoaphidis* in the biological control of aphids. In: Aphid antagonists, E.C. Experts' Meeting, Portici, nov. 1982. Ed. R. Cavalloro, A.A. Balkema. Publ. Rotterdam. EUR 8601 EN, 20-32
- REMAUDIERE G. (1983) Biological control of cereal aphids with entomophthorales. CEC programme on integrated and biological control. Progress report 1979/1981. Eds. R. Cavalloro and A. Piavaux, EUR 8273 EN, 227-246
- SILVIE P. (1983) Survie expérimentale des corps expérimentaux de *Erynia neoaphidis*, Entomophthorale pathogène de Pucerons. Thèse 3ème cycle, Univ. Paris XI. 65 p.
- LATGE J.P. et BOUCIAS D. "in press" Intraspecific variability in *Conidiobolus obscurus*. J. appl. Env. Microbiol

- LATGE J.P., FOURNET B., COLE G., DUBOURDIEU D. et TONG N. "in press" Composition chimique et ultrastructure des parois des corps hyphaux et des azygospores de *Conidiobolus obscurus*. Can. J. Microbiol
- LATGE J.P. et MOLETTA R. "in press" Cinétique de la croissance mycélienne de *Conidiobolus obscurus*. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)
- LATGE J.P., PAPIEROK B. et SAMPEDRO L. "in press" Agressivité de *Conidiobolus obscurus* vis-à-vis du puceron du pois. I. Comportement des conidies sur la cuticule avant la pénétration de tube germinatif dans l'insecte. Entomophaga
- LATGE J.P., SAMPEDRO L. et HALL R.A. "in press" Agressivité de *Conidiobolus obscurus* vis-à-vis du puceron du pois. III. Activités enzymatiques exocellulaires. Entomophaga
- LATGE J.P. et SANGLIER J.J. "in press" Utilisation des plans factoriels pour l'étude des facteurs influençant la croissance et la sporulation de *Conidiobolus obscurus*. Can. J. Bot.
- PAPIEROK B., VALADAO L., TORRES B. et ARNAULT M. "in press" Contribution à l'étude de la spécificité parasitaire du Champignon entomopathogène *Zoophthora radicans* (Brefeld), Batko (Zygomycètes, Entomophthorales). Entomophaga
- SAMPEDRO L., UZIEL A. et LATGE J.P. "in press" Agressivité de *Conidiobolus obscurus* vis-à-vis du puceron du pois. II. Mode de germination *in vitro* des conidies primaires de souche d'agressivité différente. Mycopathologia

#### BREVET

- LATGE J.P. and PERRY D.F. (1980) Perfectionnements apportés aux procédés de préparation des spores durables d'Entomophthorales pathogènes d'insectes, préparation des spores ainsi obtenues et compositions phytosanitaires contenant les dites préparations. Demande de brevet N.° 80.24.769 déposée le 21.XI.1980